

Caspase-9 选择性剪切及其在非小细胞肺癌治疗中的应用 *

匡彦蓓^{1,2,3,4)} 李 萍^{1,2,3)**} 李 强^{1,2,3)**}

⁽¹⁾ 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000; ⁽²⁾ 中国科学院重离子束辐射生物学重点实验室, 兰州 730000;

⁽³⁾ 甘肃省重离子束辐射医学应用基础重点实验室, 兰州 730000; ⁽⁴⁾ 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 越来越多的证据指出前体 mRNA 选择性剪切的调节在癌症病理生理学上的重要性. 在非小细胞肺癌(NSCLC)的发生及发展中 caspase-9 mRNA 的选择性剪切发挥着重要作用, caspase-9 的 2 个剪切异构体 caspase-9a 和 caspase-9b 的比值与 NSCLC 肿瘤的发生和维持密切相关, 并且调节该比值关系会影响到 NSCLC 细胞对于抗癌治疗的敏感性. 因此, caspase-9 的选择性剪切是目前 NSCLC 治疗和诊断最受关注的焦点. 本文就 caspase-9 的选择性剪切及其在 NSCLC 治疗中的应用展开综述.

关键词 caspase-9, 选择性剪切, caspase-9a/9b, 非小细胞肺癌, 化学药物治疗, 敏感性

学科分类号 Q2, Q6

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0277

随着全球科技进步和发展, 医疗水平不断得到提高, 但是仍有许多疾病的死亡率高居不下, 威胁着人类的健康, 癌症就是众多疾病杀手之一. 由于环境污染日益严重, 特别是在城市中, 在人口密集、人口老龄化、化石能源需求量加大等各方面因素的作用下, 肺癌成为高发恶性肿瘤之一. 世界卫生组织国际癌症研究署(IARC) 2010 年发布的 GLOBOCAN2008 癌症报告^[1-2]显示: 全球肺癌新发病例和死亡病例分别占恶性肿瘤新发病例及死亡病例的 13% 及 18%, 居全球恶性肿瘤首位^[3]. 在中国, 据统计 2000~2011 年, 肺癌的发病率及死亡率已居所有恶性肿瘤之首, 其中男性发病率和死亡率居第一位, 女性发病率居第二位(低于乳腺癌), 死亡率居第一位^[4]. 同时, 也有数据预测, 对于 75 岁以上的男性, 肺癌是最高发病率的癌症, 而 60 岁以上女性最常见的恶性肿瘤为肺癌, 并且城市人口肺癌的发病率显著高于农村人口, 未来肺癌将仍是导致癌症死亡的首因^[4]. 在肺癌患者中有 85% 的患者被确诊为非小细胞肺癌(NSCLC), NSCLC 是最常见的肺癌亚型. 治疗癌症传统的化学药物治疗(化疗)和放射治疗(放疗)在提高晚期肺癌病人的存

活率上已经到达瓶颈期, 再加上化疗和放疗所带来的毒副作用, 治疗效果并不理想. 虽然近几年进入人们视线的分子靶向治疗取得了一定的成效, 例如, 埃罗替尼作为 EGFR 的小分子抑制剂在临床治疗 NSCLC 时有不错的疗效, 但是棘手的问题也随之出现. 例如, 在 EGFR 靶向治疗过程中, 癌细胞经常会对埃罗替尼产生抗性, 表现为获得 T790M 二次突变^[5]. 因此, 迫切地需要了解 NSCLC 肿瘤发生和维持的分子机制, 从中找出适当的切入点来为 NSCLC 的治疗提供新的靶点. 国内外许多科研工作者致力于这方面研究, 并取得了一些很有价值的研究结果, 越来越多的结果表明前体 mRNA 选择性剪切异构体的功能在癌症病理学中的重要性. 特别是在 NSCLC 中, caspase-9 的选择性剪切与

* 国家自然科学基金重点项目(U1232207), 国家自然科学基金青年基金(11305223), 科技部重点研发计划(2016YFC0904700)和国家科技支撑计划重点项目(2015BAI01B11)资助.

** 通讯联系人.

李 萍. Tel: 0931-4969173, E-mail: liping@impcas.ac.cn

李 强. Tel: 0931-4969316, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn

收稿日期: 2016-09-06, 接受日期: 2017-03-01

NSCLC 肿瘤的发生、形成和维持密切相关. 本文对 caspase-9 的选择性剪切及其在 NSCLC 治疗中的应用进行了综述.

1 Caspase-9 的选择性剪切

RNA 的选择性剪切是人类基因组中蛋白质多样性的主要原因. 通过选择性剪切, 一个单一的前体 mRNA 可以产生多个不同的成熟 mRNA, 这些 mRNA 编码结构和功能不同的蛋白质. 选择性剪切通过选择性地使用前体 mRNA 中的外显子来修饰翻译产物蛋白质的稳定性、位置、功能结构域等生物学特性. 最新基于寡核苷酸的大通量基因芯片技术的研究表明超过 90% 的人类基因存在剪切异构体^[6-7]. 前体 mRNA 的选择性剪切影响着基本的生物进程, 并且在人类疾病发生发展中起着重要作用, 包括癌症^[8]. CD44 作为一种多功能细胞表面糖蛋白, 参与细胞增殖、分化、黏附、迁移等过程, CD44 的前体 mRNA 通过选择性剪切可以产生多种 CD44 的亚型, 其中包含外显子 v5、v6、v7 的亚型在多种肿瘤中都发生了超表达, 并且这些变体在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥着重要作用^[9]. 有少量报道一致指出调节剪切事件的反式因子与癌细胞的表型有密切关联. 例如, Sharp 等^[10]发现转录因子 SRm160 能够调节 CD44 的选择性剪切, 并且该基因的表达与肿瘤侵袭能力有关. Karin 等^[11]发现, 在多种人类肿瘤细胞中, 转录因子 SRp30a 发生超表达, 并且该转录因子能够调节癌症相关基因 B1N1、S6K1 等的选择性剪切. Carstens 等^[12]发现反式调节因子 ESRP1 和 ESRP2 能够调节 FGFR2 mRNA 的选择性剪切, 并且 FGFR2 的选择性剪切会影响上皮细胞和间质细胞之间的转化过程. 另外, Bonomi 等^[13]发现转录因子 SRp30a 能够调节

Ron 前体 mRNA 的选择性剪切并对上皮细胞和间质细胞之间的转化过程产生影响. 通过利用强大的基因组技术, 选择性剪切异构体日渐成为新的癌症相关标记物, 同时也被视为潜在的介入治疗的靶点. 有研究表明 Bcl-x 选择性剪切异构体 Bcl-x_L 的表达与 NSCLC 肿瘤患者的存活时间密切相关, Bcl-x_L 的超表达暗示着 NSCLC 患者的不良预后^[14]. 因此, 选择性剪切在肿瘤的发生和维持中的作用也越来越受到研究者的关注.

细胞凋亡是细胞在受到内源性或者外源性的信号刺激, 以及受到胁迫时执行细胞死亡的程序. 多种因子通过凋亡复合体机制调节着细胞凋亡. 凋亡复合体是细胞凋亡过程中形成的多蛋白复合结构, 它负责 caspase 凋亡执行因子的激活. Caspase-9 在细胞内源性凋亡通路中被各种化学因素、胁迫因子以及电离辐射所激活^[15-23], 并且被视为肿瘤抑制子^[24]. 文献报道 caspase-9 的表达一部分是由转录时选择性剪切来调节^[19-20], 其通过包含或排斥外显子盒 3, 4, 5, 6 分别产生 caspase-9a 和 caspase-9b 两个作用相互拮抗的剪切异构体, 这一选择性剪切的过程如图 1 所示. 包含 4 个外显子盒的成熟转录本产生促凋亡的 caspase-9a, 而排斥 4 个外显子盒的转录本产生促存活的 caspase-9b^[19-20]. Caspase-9b 蛋白虽然缺少催化结构域但是它保留了其他所有的氨基酸序列, 例如凋亡蛋白酶激活因子 (APAF-1) 结合区域^[19-20]. 由于凋亡复合体负责 caspase-9a 的激活, caspase-9b 会通过和 caspase-9a 竞争性结合凋亡复合体来抑制 caspase-9a 的活性. 也有人认为 caspase-9b 能够与 caspase-9a 形成异二聚体从而导致 caspase-9a 不能够自体激活^[19]. 实质上, 功能性获得 caspase-9b 剪切异构体可能是决定细胞对凋亡敏感或产生抗性的关键因素.

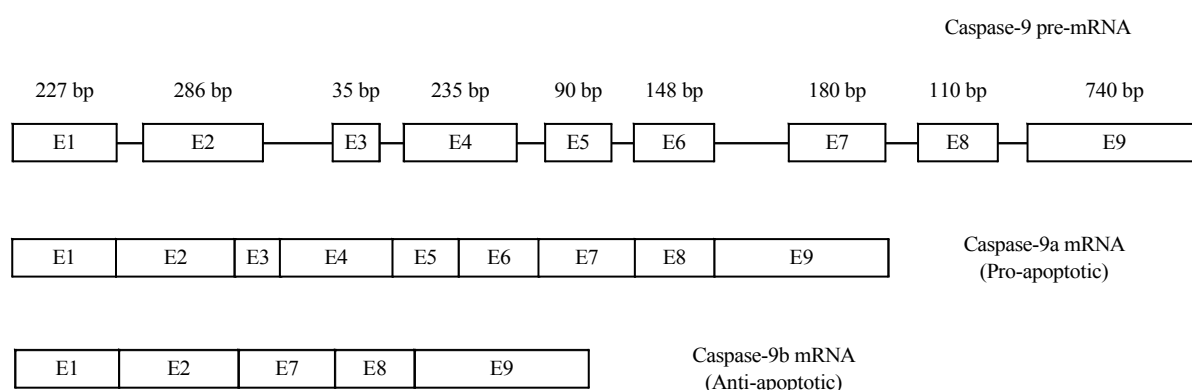


Fig. 1 The alternative splicing of caspase-9

图 1 Caspase-9 的选择性剪切

在 NSCLC 患者肿瘤的几个亚型中, 包括腺癌、鳞状细胞癌、大细胞癌, caspase-9 的选择性剪切均发生异常调节. 有数据显示, NSCLC 肿瘤细胞和已转化的肺上皮细胞中有相当大的一部分细胞表现出了 caspase-9 选择性剪切的严重失调, 具体表现为 NSCLC 肿瘤细胞 caspase-9a/9b mRNA 的比值低于正常组织^[26], 同时伴随 caspase-9a 活性明显降低和抗凋亡表型的 caspase-9b 超表达^[25-26]. 也有研究进一步证明 caspase-9b 异常表达对 NSCLC 肿瘤细胞的发生、维持起重要作用. Caspase-9b 表达的下调能够使多种 NSCLC 细胞系失去锚定非依赖性生长的能力^[25], 同时还能抑制已接种 NSCLC 细胞的免疫缺陷小鼠肿瘤的形成^[26]. 相反, 通过转入外源基因上调 caspase-9b 的表达能够显著性地提高多种 NSCLC 细胞锚定非依赖性生长的能力^[25], 同时也会导致体内实验肿瘤体积的增大^[25]. 因此, 上述研究将低 caspase-9a/9b 比值确定为 NSCLC 特有的机制, 这一机制是 NSCLC 细胞获得成瘤能力所必需的.

2 Caspase-9 mRNA 选择性剪切的调节

Caspase-9a/9b 的比值与 NSCLC 肿瘤的发生与维持密切相关, 因此迫切需要对 caspase-9 mRNA 选择性剪切的调节机制有更深入的了解, 许多科研工作者在这方面进行了大量研究, 并取得了一些成果.

2.1 RNA 顺式作用元件对 caspase-9 选择性剪切的调节

选择性剪切是对一条前体 mRNA 上的一些内含子和外显子进行包含或者排除的加工, 因此必须准确识别内含子边界序列, 而内含子的 5' 和 3' 边界序列保守性较差, 容易出现加工失误, 但细胞内有一套机制来防范不正确的 mRNA 剪切. 目前已发现, 在许多基因外显子与内含子的近边界位置含有顺式作用序列元件辅助真假剪切位点的识别^[27-28]. 这些顺式作用元件包括外显子剪切增强子(ESE)、外显子剪切沉默子(ESS)、内含子剪切增强子(ISE)和内含子剪切沉默子(ISS). 外显子的包含和排斥由这些竞争性剪切调控元件的相对平衡来实现, 而这些调控元件的活性又由相应的剪切调控因子的结合来决定^[29].

目前在 caspase-9 mRNA 上已鉴定出 5 个顺式作用元件, 如表 1 所列. 其中, 对 C9-E3/ESS 和 C9-I6/ISE 有较深入的了解. 通过研究已经确定 hnRNPs 家族中的 hnRNP A2/B1、hnRNP L、hnRNP R 以及 hnRNP U 会与 C9-E3/ESS 特异性结合, 其中 hnRNP A2/B1 对于 caspase-9 选择性剪切的调节机制目前还没有较深入了解, hnRNP R 对于 caspase-9a/9b 的比值没有显著的调节作用, hnRNP L 和 hnRNP U 对于 caspase-9 选择性剪切的调节会在后文详细介绍.

Table 1 Identified cis-elements on caspase-9 mRNA
表 1 Caspase-9 mRNA 上已鉴定出的顺式作用元件

序号	位点	名称	野生型序列
1	Exon 3	C9-E3/ESS	GAGAGTTTGAGGGGAAAT
2	Intron 6	C9-I6/ISE	TGGGTGGGT
3	Exon 4	C9-E4/ESS-1	CCTGAGCATGGAGC
4	Exon 4	C9-E4/ESS-2	TGAAGGGCG
5	Exon 6	C9-E6/ESS	AAGCCCAAGC

除此之外, 目前还确定了 SR 蛋白家族中的转录因子 SRp30a 会与 C9-I6/ISE 特异性结合来调控 caspase-9 的选择性剪切, 具体的调节过程会在后面的内容中详细描述. 其他 3 个顺式作用元件的具体调节机制目前并不了解, 但是这 5 个顺式作用元件中每个顺式元件的突变都会导致 caspase-9a/9b 比值的调节失常. 从而证明了它们对 caspase-9 选

择性剪切的调节作用^[30].

2.2 反式作用结合蛋白对 caspase-9 选择性剪切的调节

顺式作用元件是位于一条前体 mRNA 上并对其选择性剪切具有调节功能的核苷酸序列, 并且顺式元件作用的发挥离不开与之结合的转录因子, 转录因子也称为反式作用结合蛋白或者反式作用因

子. 反式作用因子直接或者间接与 mRNA 上的顺式作用元件结合, 参与调控靶基因的转录效率. 目前在 NSCLC 中发现参与 caspase-9 的选择性剪切调节的反式作用因子有 hnRNPs 和 SR 蛋白.

2.2.1 hnRNPs 对 caspase-9 选择性剪切的调节

核不均一核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNPs)是由多种 RNA 结合蛋白组成的具有多种功能的多肽家族, 包含 20 多种蛋白质. hnRNPs 蛋白结构相似, 主要包含 2 个位于氨基端的 RNA 结合结构域(RBD I 和 RBD II)以及位于羧基端的富含甘氨酸的结构域. RNA 结合域能形成茎环结构, 是与前体 mRNA 结合的重要部位. hnRNP 家族的蛋白结构区别在于 RBD I 和 RBD II 的序列组成, RNA 结合域的序列变化是 hnRNP 蛋白家族中不同蛋白质功能特异性的决定因素. hnRNPs 通过 RNA 结合域与前体 mRNA 结合形成复合体, 调节着前体 mRNA 的选择性剪切^[31].

Goehe 等发现 hnRNP 家族中的 hnRNP L 和 hnRNP U 这两个转录调节因子可以与 caspase-9

mRNA 上的顺式作用元件 C9-E3/ESS 结合从而调节 caspase-9 的选择性剪切^[25, 32], 具体调节过程如图 2 所示. hnRNP L 和 hnRNP U 都能与 C9-E3/ESS 进行特异性结合, hnRNP U 与 C9-E3 结合后抑制 caspase-9b 的合成, 使 caspase-9a/9b 的比值维持在较高的状态. 当 hnRNP L 的 Ser⁵² 磷酸化后, 会与 hnRNP U 竞争性结合 C9-E3, 磷酸化的 hnRNP L 与 C9-E3 结合后, 会促进 caspase-9b 的合成, 使 caspase-9a/9b 的比值下降, 并且 hnRNP L 的磷酸化是依赖于 AKT 通路的. 在正常细胞中, hnRNP U 与 hnRNP L 的表达量相同, 但 hnRNP U 与 C9-E3 的结合要显著性地高于 NSCLC 细胞, 因此正常细胞的 caspase-9a/9b 的比值维持在正常状态. 相反, 在 NSCLC 细胞中, 由于 AKT 通路的激活(这可能与 EGFR 突变有关), hnRNP L 发生磷酸化, 并与 hnRNP U 竞争性结合 C9-E3, 导致了 caspase-9a/9b 比值的下降. 也就是说, hnRNP U 会与 hnRNP L 竞争性地结合 C9-E3 并且增强 caspase-9 mRNA 包含 4 个外显子盒的选择性剪切, 但这个过程会被 AKT 通路所磷酸化的 hnRNP L 抑制.

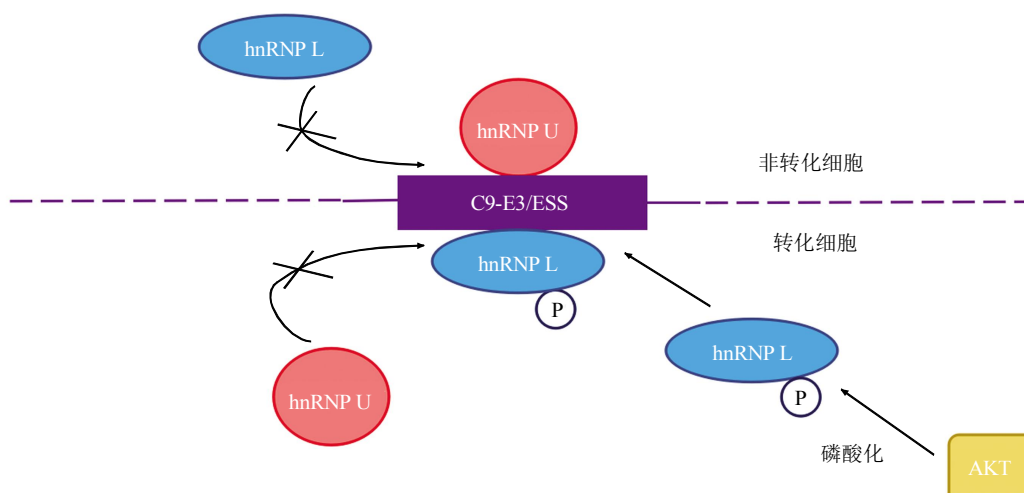


Fig. 2 Model for controlling hnRNP U-hnRNP L-C9/E3 interaction by the AKT pathway

图 2 依赖 AKT 通路的 hnRNP U-hnRNP L-C9/E3 控制模型

图中虚线上半部分和下半部分分别表示在 NSCLC 非转化细胞和转化细胞中 caspase-9 选择性剪切的调节过程.

2.2.2 SR 对 caspase-9 选择性剪切的调节

SR 蛋白得名于其氨基酸序列中富含的丝氨酸(S)和精氨酸(R)残基. SR 蛋白共同的结构是位于氨基端的 RNA 结合结构域和位于羧基端的富含丝氨酸和精氨酸的 RS 结构域^[33]. 各 SR 蛋白在固有剪切和可变剪切中有多种作用, 其中之一是识别并结

合 ESS 或 ISE, 提高相邻剪切位点的活性, 在前体 mRNA 的选择性剪切和加工中发挥作用. 有多篇报道表明 SR 蛋白家族中的 SRp30a 可以通过其磷酸化形式的转换与顺式作用元件 C9-I6/ISE 特异性结合来调节 caspase-9 的选择性剪切.

a. SRp30a 基于 PI3K/AKT 通路对 caspase-9 选择性剪切的调节. 在 NSCLC 细胞中, 大约有 5%~10% 的细胞发生了 EGFR 突变, 约 70% 的细胞 EGFR 发生了超表达^[26]. Shultz 等^[30]的研究表明, NSCLC 细胞中, EGFR 突变会导致下游 PI3K/AKT 通路的激活, 这一通路的激活会使得 AKT 的底物蛋白磷酸激酶发生活化, SRp30a 蛋白 RS 结构域中的丝氨酸是该蛋白磷酸激酶的特异性底物, 因此 PI3K/AKT 通路的激活会使得 SRp30a 第 199、201、227、234 位点的丝氨酸磷酸化, 磷酸化的 SRp30a 会与 caspase-9 mRNA 上的顺式作用元件 C9-I6/ISE 特异性结合, 抑制 caspase-9 mRNA 对 3, 4, 5, 6 外显子盒的包含作用, 从而促进 caspase-9b 的合成, 降低 caspase-9a/9b 的比值. 这一调节过程如图 3 中的上半部分所示. 也就是说, 磷酸化的 SRp30a 可以与 caspase-9 mRNA 上的顺式作用元件 C9-I6 结合, 并促进 caspase-9b 的合成, 并且 SRp30a 的磷酸化依赖于 PI3K/AKT 通路的激活.

b. SRp30a 基于内源性神经酰胺的合成对 caspase-9 选择性剪切的调节. 神经酰胺(ceramide)是应激反应和生长发育中重要的调节因子. 神经酰胺的来源有鞘磷脂的水解和从头合成途径, 在肿瘤坏死因子 α 、干扰素 γ 、紫外线、加热、脂肪酸合

酶抗原、神经生长因子等的刺激下会激活这些通路的应答. Chalfan 等^[34]的研究发现, SRp30a 的去磷酸化会导致 caspase-9a/9b 比值的上升, 并且这一过程依赖于内源性神经酰胺合成通路, 具体调节过程如图 3 下半部分所示. 在外界一些化学因素的刺激下, 内源性神经酰胺从头合成的途径被激活, 内源性神经酰胺会激活通路下游的 I 型蛋白磷酸酶 (PP1), PP1 使磷酸化的 SRp30a 去磷酸化, 去磷酸化的 SRp30a 与 caspase-9 mRNA 上的顺式作用元件 C9-I6/ISE 特异性结合, 增强 caspase-9 mRNA 对于 3, 4, 5, 6 外显子盒的包含作用, 促进 caspase-9a 的合成, 升高 caspase-9a/9b 的比值. 也就是说, 去磷酸化的 SRp30a 可以与 C9-I6 特异性结合, 抑制 caspase-9b 的合成, 并且这一调节过程依赖于内源性神经酰胺的从头合成.

综上所述, 转录因子 SRp30a 是通过其磷酸化状态的转换和与 C9-I6 的特异性结合来进行对 caspase-9 选择性剪切的调节, 磷酸化的 SRp30a 会促进 caspase-9b mRNA 的合成, 而去磷酸化的 SRp30a 会抑制 caspase-9b mRNA 的合成, 并且 SRp30a 的磷酸化和去磷酸化分别依赖于 PI3K/AKT 通路的激活和内源性神经酰胺的从头合成.

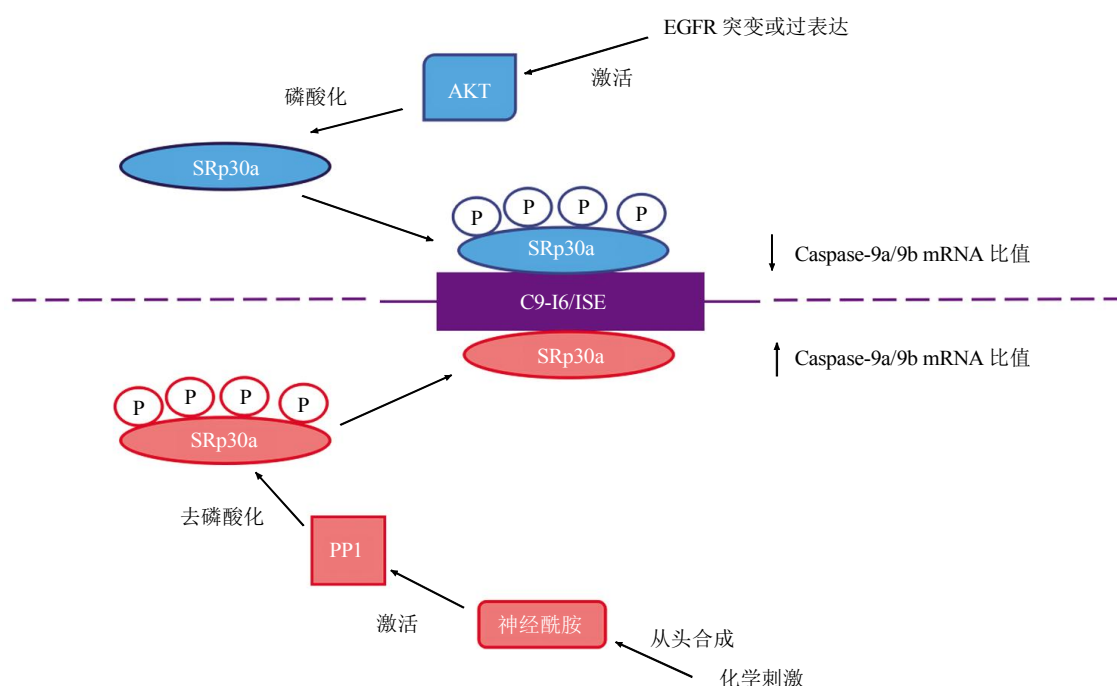


Fig. 3 Trans-acting factor SRp30 regulating the alternative splicing of caspase-9 via combining with C9-I6

图 3 反式调节因子 SRp30a 通过与 C9-I6 结合调节 caspase-9 的选择性剪切

图中虚线上半部分和下半部分分别表示了 SRp30a 的磷酸化和去磷酸化对 caspase-9 的选择性剪切的调节过程.

3 NSCLC 细胞中 caspase-9b 对 NF- κ B 信号通路的调节

核因子 κ B (NF- κ B) 普遍存在于真核生物的细胞中, 是重要的转录因子, 在细胞的炎症反应、免疫应答、生长、分化、凋亡以及肿瘤的发生过程中均发挥重要作用^[35-37]. NF- κ B 通路是促存活或者致癌通路. 据报道 NF- κ B 转录因子调节超过 200 个基因的表达, 其中有许多基因编码抗凋亡蛋白^[38]、细胞周期调控因子^[39-40]、血管生成因子以及和细胞迁移、黏着有关的蛋白^[41-42]. 重要的是, 有研究表明 NF- κ B 通路在多种癌症(例如, 肺癌^[43-44])中表现为组成型激活, 并引发化疗药物抗性的产生^[43-47]. NF- κ B 的激活也导致小鼠模型中肺癌的形成、发展和转移^[40, 48-51].

NF- κ B 信号通路的激活分为经典和非经典的 NF- κ B 通路. 经典途径是指细胞在静息状态下, 细胞质中的 p50/p65 与 I κ B 结合成三聚体, 使 p50/

p65 不能进入细胞核. 当细胞受到外部信号刺激时, I κ B 会被 I κ B 激酶 (IKK) 磷酸化, 特别是 I κ B α , 然后 I κ B α 发生自身多泛素化, 并随后被蛋白酶体降解. I κ B 降解后解离出 NF- κ B, 活化的 NF- κ B 释放并进入细胞核中与相应的靶序列结合调节基因的表达. 非经典的 NF- κ B 通路是通过肿瘤坏死因子 (TNF) 受体家族成员与 TNF 受体相关因子 TRAF2、TRAF3 的结合而被激活的. 当细胞受到外界信号刺激后, 在 NF- κ B 诱导激酶 (NIK) 的作用下使 IKK α 磷酸化并进一步使 p100 磷酸化进而被相应的酶剪切形成有活性的 p52/RelB 复合物, 该复合物可进入细胞核调节相关基因的转录.

Chalfant 等^[52]发现在 NSCLC 细胞中 caspase-9b 能够激活经典的 NF- κ B 通路同时抑制非经典的 NF- κ B 通路, 并且这种调节作用的发挥和 caspase-9a 无关. 细胞凋亡抑制蛋白 cIAP1 在 caspase-9b 介导的 NF- κ B 信号通路调节过程中发挥重要作用. 具体的调节过程如图 4 所示.

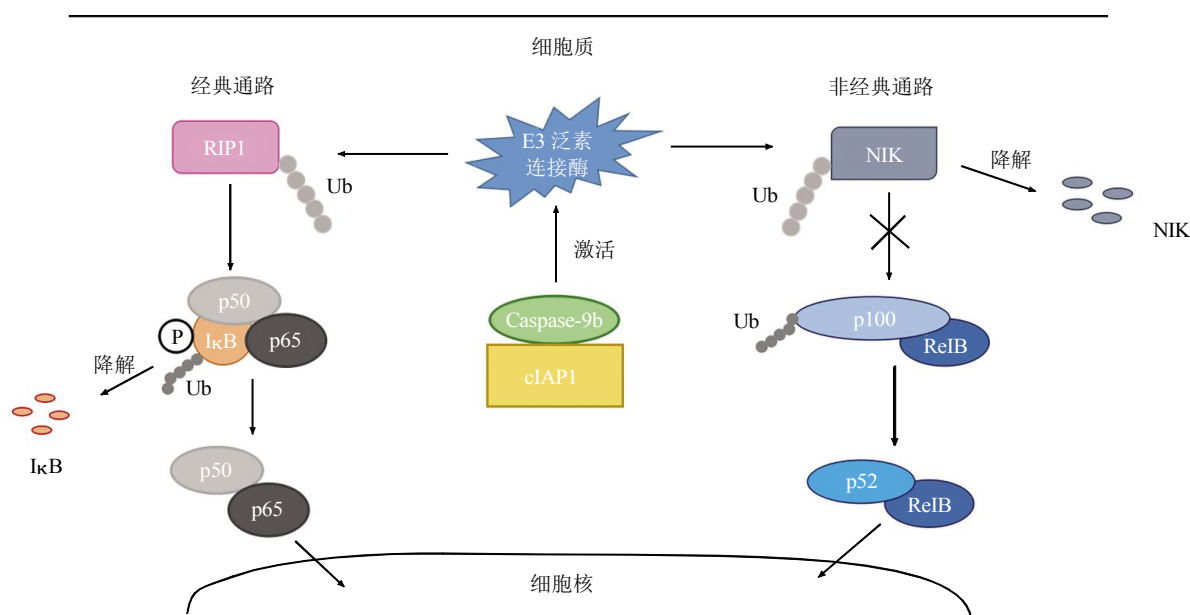


Fig. 4 Caspase-9b regulating the NF- κ B signaling pathway via interacting directly with cIAP1

图 4 NSCLC 细胞中 caspase-9b 对于 NF- κ B 信号通路的调节

Caspase-9b 通过 IAP 蛋白结合区域的 BIR3 直接与 cIAP1 结合, 二者结合后激活 E3 泛素连接酶, 活化的 E3 泛素连接酶诱导 RIP1 的泛素化来激活经典的 NF- κ B 信号通路. RIP1 泛素化后进一步促进 I κ B 降解, 从而使 I κ B 释放 p50/p65 二聚体

并暴露其核定位信号, p50/p65 二聚体进入细胞核后调节相关基因的转录. Caspase-9b 通过这种方式激活经典的 NF- κ B 信号通路并最终使得 NSCLC 细胞的存活能力和锚定非依赖性生长能力得到提高.

另一方面, caspase-9b 与 cIAP1 结合后, E3 泛

素连接酶的激活还会引起 NIK 的泛素化, NIK 降解后, 通路下游的 p100/RelB 无法激活, 不能形成有活性的 p52/RelB 二聚体进入细胞核, 从而使非经典的 NF- κ B 通路受到抑制。

综上所述, caspase-9b 在经典和非经典的 NF- κ B 通路中发挥着相反的作用, 从而说明这两个通路激活后可能调节着不同基因的转录并最终对细胞产生相反的影响。可以确定的是, caspase-9b 通过激活经典的 NF- κ B 信号通路提高了 NSCLC 细胞的锚定非依赖性生长能力, 促进了 NSCLC 细胞的存活和其肿瘤的形成。

4 Caspase-9 的选择性剪切在 NSCLC 治疗和诊断中的应用前景

目前, 越来越多的研究表明调节癌症相关基因的选择性剪切是具有前景的癌症治疗方式, 这种方法能有效避免生物适应抗性的出现。因此, 在 NSCLC 的治疗中, caspase-9 的选择性剪切成为了目前研究的重要靶点。

有研究表明, 在多种 NSCLC 细胞系中 EGFR-PI3K-AKT 通路作为一个促分裂通路, 在癌变早期调控着 caspase-9 的选择性剪切, 促进 caspase-9b 的合成, 而且 EGFR 的突变或者超表达是 NSCLC 细胞获得锚定非依赖性生长能力所必需的^[26]。特别地, caspase-9b 的下调会降低 HBEC-3KT 细胞 (EGFR 第 19 个外显子突变) 的锚定非依赖性生长能力^[26]。这是一个非常重要的发现, 因为 EGFR 突变或者 EGFR 的超表达基本出现在所有上皮细胞癌症中^[53]。有趣的是, EGFR 的突变和超表达被认为是发生在 NSCLC 之前, 因为在正常表皮细胞转化和癌变之前发现了 EGFR 的突变, 因此 caspase-9 的选择性剪切在癌症形成早期出现了失调并导致 NSCLC 肿瘤的形成。基于这些发现, 可以在 NSCLC 肿瘤形成的早期做出预测和诊断, 在肿瘤恶化和转移之前采取必要的措施。

另有大量研究将 NSCLC 细胞对化疗药物的敏感性与 caspase-9 的选择性剪切联系在一起, 获得了十分有价值的结果。使用抗癌药物处理多种 NSCLC 细胞株会提高 caspase-9a/9b 的比值, 并使其接近正常的、未转化的肺上皮组织^[13]。埃罗替尼是临床治疗 NSCLC 的药物之一, 通过转入外源基因上调 caspase-9b 的表达会显著减弱埃罗替尼抑制细胞存活的作用。相反地, 下调 caspase-9b 会增加人非小细胞肺癌 A549 细胞对于埃罗替尼的敏感

性, 表现为半致死剂量明显下降。因此 caspase-9 mRNA 的选择性剪切会影响 NSCLC 细胞对于埃罗替尼的敏感性^[26]。这种 NSCLC 特有的末端剪切机制与 NSCLC 对于化疗药物的敏感性有密切联系, 并且这不仅仅是针对埃罗替尼这一种药物。例如, 增加 caspase-9b 的表达量, 会导致 NSCLC 细胞对道诺霉素、顺铂和紫杉醇的敏感性降低, 反过来, 降低 caspase-9b 的表达量会导致这些化疗药物半致死剂量明显下降^[30]。此外, 还有研究表明 caspase-9 选择性剪切的调控是联合道诺霉素和埃罗替尼治疗 NSCLC 发挥协同作用的主要机制^[30]。因此, 直接调节 caspase-9 的选择性剪切可以改变 NSCLC 细胞对于化疗药物的敏感性。在我们尚未发表的研究中, 发现直接调节 caspase-9 的选择性剪切还能改变 NSCLC 细胞对电离辐射的敏感性, 升高 caspase-9a/9b 的比值会增加 A549 细胞对于 X 射线的辐射敏感性。因此, 在 NSCLC 的化疗和放疗中, caspase-9 的选择性剪切有望成为重要的治疗靶点。通过调节 caspase-9 的选择性剪切, 可以增加 NSCLC 细胞对于抗癌治疗的敏感性, 那么就可以发展化疗、放疗和分子治疗相结合的联合治疗模式, 由于增敏手段的一致性, 可以在增强疗效的同时大大降低联合治疗对患者带来的毒副作用。

5 结论和展望

越来越多的证据指出选择性剪切的调节在癌症病理生理学上的重要性, caspase-9 的前体 mRNA 的选择性剪切就是一个非常好的例证。大量研究表明 caspase-9 的选择性剪切在 NSCLC 的形成和对化疗的敏感性等方面发挥着重要作用。这为基于 caspase-9 选择性剪切机制治疗 NSCLC 设计特异性靶向治疗提供了理论基础。除此之外, 也有研究表明 caspase-9b 在其他癌症的发生中也发挥着作用。例如, 在头颈部鳞癌细胞中也发现了 caspase-9b 的抗凋亡作用。用紫杉醇处理头颈部鳞癌细胞会引起细胞的凋亡, 在整个应答过程中 caspase-8、caspase-10 和 caspase-3 都被激活, 但 caspase-9b 通过和 caspase-9a 竞争性结合凋亡蛋白酶激活因子 (APAF-1) 抑制了 caspase-9a 的活性, 从而起到抑制细胞凋亡的作用^[54]。40% 的慢性淋巴细胞白血病患者表现出 caspase-9b 的表达失调, 其中 28% 表现为重度失调, 12% 表现为中度失调, caspase-9b 的表达异常有可能是慢性淋巴细胞白血病潜在的生物标记^[55]。这些结果表明 caspase-9 的选择性剪切的失

调很有可能出现在多种癌症类型中,它有可能不再是 NSCLC 特有的机制,而是一部分肿瘤甚至所有肿瘤的共性,但目前关于在 NSCLC 中 caspase-9 的选择性剪切的研究相较其他癌症类型仍处于主导地位。

基于现阶段在 NSCLC 中 caspase-9 选择性剪切分子机制的发现,调节 caspase-9a/9b 的比值不仅能增加 NSCLC 细胞对于化疗药物的敏感性还能改变 NSCLC 细胞锚定非依赖性生长的能力和肿瘤形成的能力,那么针对这一点不仅可以设计分子靶向药物来增强化疗的疗效,还能设计药物促进 NSCLC 细胞的凋亡从而有效解决一些分子靶向药物引发的生物适应性突变的产生。除此之外,本实验室发现调节 caspase-9a/9b 的比值也会影响 NSCLC 细胞对于电离辐射的敏感性,说明这一机制的应用可以从化疗和分子靶向治疗中推广到放射治疗。癌症的治疗模式越来越趋向于联合治疗,因此 caspase-9 选择性剪切这一机制有望发展成 NSCLC 联合治疗的关键靶点。

少量研究揭示了 caspase-9b 在其他癌症中的表达失调。本实验室尚未发表的研究结果显示,通过调节 caspase-9a/9b 的比值改变肿瘤细胞对电离辐射的敏感性也适用于其他肿瘤细胞。目前尚不明确 caspase-9 的选择性剪切调节机制是否是 NSCLC 细胞所特有。假设这一机制是一部分肿瘤甚至所有肿瘤共有的机制,就会对肿瘤在分子水平上的分类以及治疗产生重大影响,因此对这一机制在肿瘤病理生理学中的研究具有不容忽视的临床意义。

目前迫切需要对 NSCLC 相关的 caspase-9 选择性剪切调节的分子机制有更深入的了解,从而为 NSCLC 的治疗提供适当的分子靶点,提高 NSCLC 患者的治愈率。除此之外,还需要更多的证据揭示 caspase-9 选择性剪切调节的分子机制在其他癌症类型中的生理学意义,为基于这一靶点的治疗理念的推广提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Ferlay J, Shin H R, Bray F, *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 2010, **127**(12): 2893–2917
- [2] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, **61**(2): 69–90
- [3] 姚晓军, 刘伦旭. 肺癌的流行病学及治疗现状. *现代肿瘤医学*, 2014, **22**(8): 1982–1986
- [4] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2016, **66**(2): 115–132
- [5] Pao W, Miller V A, Politi K A, *et al.* Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*, 2005, **2**(3): 73
- [6] Kampa D, Cheng J, Kapranov P, *et al.* Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res*, 2004, **14**(3): 331–342
- [7] Johnson J M, Castle J, Garrett-Engele P, *et al.* Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science*, 2003, **302**(5653): 2141–2144
- [8] Venables J P. Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res*, 2004, **64**(21): 7647–7654
- [9] 王科俊, 吕俊杰, 冯伟兴, 等. 可变剪接与疾病的生物信息学研究概况. *生命科学研究*, 2011, **14**(3): 331–342
- [10] Wang K J, Lv J J, Feng W X, *et al.* Life Science Research, 2011, **14**(3): 331–342
- [11] Cheng C, Sharp P A. Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion. *Mol Cell Biol*, 2006, **26**(1): 362–370
- [12] Karni R, De Stanchina E, Lowe S W, *et al.* The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, **14**(3): 185–193
- [13] Warzecha C C, Sato T K, Nabet B, *et al.* ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing. *Mol Cell*, 2009, **33**(5): 591–601
- [14] Valacca C, Bonomi S, Buratti E, *et al.* Sam68 regulates EMT through alternative splicing-activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene. *J Cell Biol*, 2010, **191**(1): 87–99
- [15] Karczmarek-Borowska B, Filip A, Wojciorowski J, *et al.* Estimation of prognostic value of Bcl-xL gene expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2006, **51**(1): 61–69
- [16] Hajra K M, Liu J R. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis*, 2004, **9**(6): 691–704
- [17] Kominsky D J, Bickel R J, Tyler K L. Reovirus-induced apoptosis requires mitochondrial release of Smac/DIABLO and involves reduction of cellular inhibitor of apoptosis protein levels. *J Virol*, 2002, **76**(22): 11414–11424
- [18] Liang Q, Liou A K, Ding Y, *et al.* 6-Hydroxydopamine induces dopaminergic cell degeneration via a caspase-9-mediated apoptotic pathway that is attenuated by caspase-9dn expression. *J Neurosci Res*, 2004, **77**(5): 747–761
- [19] Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak T J, *et al.* Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Exp Oncol*, 2004, **26**(2): 82–97
- [20] Seol D W, Billiar T R. A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis. *J Biol Chem*, 1999, **274**(4): 2072–2076
- [21] Srinivasula S M, Ahmad M, Guo Y, *et al.* Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can

- regulate apoptosis. *Cancer Res*, 1999, **59**(5): 999–1002
- [21] Stephanou A, Scarabelli T M, Knight R A, *et al.* Antiapoptotic activity of the free caspase recruitment domain of procaspase-9: a novel endogenous rescue pathway in cell death. *J Biol Chem*, 2002, **277**(16): 13693–13699
- [22] Wu G S, Ding Z. Caspase 9 is required for p53-dependent apoptosis and chemosensitivity in a human ovarian cancer cell line. *Oncogene*, 2002, **21**(1): 1–8
- [23] Yacoub A, Mitchell C, Hong Y, *et al.* MDA-7 regulates cell growth and radiosensitivity *in vitro* of primary (non-established) human glioma cells. *Cancer Biol Ther*, 2004, **3**(8): 739–751
- [24] Soengas M S, Alarcon R M, Yoshida H, *et al.* Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*, 1999, **284**(5411): 156–159
- [25] Goehe R W, Shultz J C, Murudkar C, *et al.* hnRNP L regulates the tumorigenic capacity of lung cancer xenografts in mice *via* caspase-9 pre-mRNA processing. *J Clin Invest*, 2010, **120** (11): 3923–3939
- [26] Shultz J C, Goehe R W, Wijesinghe D S, *et al.* Alternative splicing of caspase 9 is modulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway via phosphorylation of SRp30a. *Cancer Res*, 2010, **70**(22): 9185–9196
- [27] Wang Z, Xiao X, Van Nostrand E, *et al.* General and specific functions of exonic splicing silencers in splicing control. *Mol Cell*, 2006, **23**(1): 61–70
- [28] Zhang X H, Chasin L A. Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes Dev*, 2004, **18**(11): 1241–1250
- [29] 富显果, 兰风华. 可变剪接及其生物学意义. *国际检验医学杂志*, 2002, **33**(11): 1333–1336
- Fu X G, Lan F H. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2002, **33**(11): 1333–1336
- [30] Shultz J C, Goehe R W, Murudkar C S, *et al.* SRSF1 regulates the alternative splicing of caspase 9 *via* a novel intronic splicing enhancer affecting the chemotherapeutic sensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res*, 2011, **9**(7): 889–900
- [31] 王亦男, 陈尧, 周宏灏. 核不均一核糖核蛋白(hnRNPs) 与肿瘤关系的研究进展. *广州医学院学报*, 2007, **35**(5): 69–72
- Wang Y N, Chen R, Zhou H Y. *Academic Journal of Guangzhou Medical College*, 2007, **35**(5): 69–72
- [32] Vu N T, Park M A, Shultz J C, *et al.* hnRNP U enhances caspase-9 splicing and is modulated by AKT-dependent phosphorylation of hnRNP L. *J Biol Chem*, 2013, **288**(12): 8575–8584
- [33] 王善治, 袁榴娣. SR 蛋白研究进展. *东南大学学报*, 2003, **22**(4): 279–281, 286
- Wang S Z, Yuan L D. *Journal of Southeast University*, 2003, **22**(4): 279–281, 286
- [34] Chalfant C E, Rathman K, Pinkerman R L, *et al.* *De novo* ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, 2002, **277**(15): 12587–12595
- [35] Hayden M S, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 2008, **132**(3): 344–362
- [36] Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, *et al.* Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol*, 2008, **9**(12): 1364–1370
- [37] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 2009, **27**(1): 693–733
- [38] Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, 2002, **3**(3): 221–227
- [39] Hinz M, Krappmann D, Eichten A, *et al.* NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(4): 2690–2698
- [40] Chen F, Lu Y, Zhang Z, *et al.* Opposite effect of NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase on p53-independent GADD45 induction by arsenite. *J Biol Chem*, 2001, **276**(14): 11414–11419
- [41] Grivennikov S I, Greten F R, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 2010, **140**(6): 883–899
- [42] Lin Y, Bai L, Chen W, *et al.* The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, **14**(1): 45–55
- [43] Karin M, Greten F R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 2005, **5**(10): 749–759
- [44] Li J, Jia H, Xie L, *et al.* Association of constitutive nuclear factor-kappaB activation with aggressive aspects and poor prognosis in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2009, **19** (8): 1421–1426
- [45] Jones D R, Broad R M, Madrid L V, *et al.* Inhibition of NF-kappaB sensitizes non-small cell lung cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Ann Thorac Surg*, 2000, **70** (3): 930–936; discussion 936–937
- [46] Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, 2005, **5**(4): 297–309
- [47] Wang C Y, Cusack J C, Jr., Liu R, *et al.* Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med*, 1999, **5** (4): 412–417
- [48] Basseres D S, Ebbs A, Levantini E, *et al.* Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res*, 2010, **70**(9): 3537–3546
- [49] Deng J, Fujimoto J, Ye X F, *et al.* Knockout of the tumor suppressor gene Gprc5a in mice leads to NF-kappaB activation in airway epithelium and promotes lung inflammation and tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, **3**(4): 424–437
- [50] Meylan E, Dooley A L, Feldser D M, *et al.* Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature*, 2009, **462**(7269): 104–107
- [51] Huang C Y, Fong Y C, Lee C Y, *et al.* CCL5 increases lung cancer migration *via* PI3K, Akt and NF-kappaB pathways. *Biochem Pharmacol*, 2009, **77**(5): 794–803
- [52] Vu N T, Park M A, Shultz M D, *et al.* Caspase-9b interacts directly

- with cIAP1 to drive agonist-independent activation of NF-kappaB and lung tumorigenesis. *Cancer Res*, 2016, **76**(10): 2977–2989
- [53] Rowinsky E K. The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Med*, 2004, **55**(1): 433–457
- [54] Maushagen R, Reers S, Pfannerstill A C, *et al.* Effects of paclitaxel on permanent head and neck squamous cell carcinoma cell lines and identification of anti-apoptotic caspase 9b. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, **142**(6): 1261–1271
- [55] Dominguez-Berrocal L, Zhang X, Zini J M, *et al.* Evaluation of Caspase-9b and PP2Aalpha2 as potential biomarkers for chronic lymphocytic leukemia. *Biomark Res*, 2016, **4**(1): 1–6

The Alternative Splicing of Caspase-9 and Its Application in Therapy of NSCLC*

KUANG Yan-Bei^{1,2,3,4)}, LI Ping^{1,2,3)**}, LI Qiang^{1,2,3)}**

⁽¹⁾ Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

⁽²⁾ Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

⁽³⁾ Key Laboratory of Basic Research on Heavy Ion Radiation Application in Medicine, Gansu Province, Lanzhou 730000, China;

⁽⁴⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Mounting evidence indicates the functional importance of alternative splice variations in cancer pathophysiology. The alternative splicing of caspase-9 plays an important role in non-small cell lung cancer (NSCLC). The splicing of caspase-9 gene generates two isoforms caspase-9a and caspase-9b, the ratio of caspase-9a/9b mRNA is pretty lower in a large proportion of human NSCLC tumors. A low caspase-9a/9b ratio, demanded for the tumorigenicity of NSCLC cells, is correlated with the sensitivity of NSCLC cells to anticancer therapy. Thus, the alternative splicing of caspase-9 suggests a novel and crucial distal mechanism in NSCLC and offers promise of a new target for the development of therapeutics in the defense against cancers. Therefore, this review is to summarize the alternative splicing of caspase-9 and its application in the therapy of NSCLC.

Key words caspase-9, alternative splicing, caspase-9a/9b, NSCLC, chemotherapy, sensitivity

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0277

* This work was supported by grants from The Key Project of National Natural Science Foundation of China (U1232207), The National Natural Science Foundation of China (11305223), The National Key Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (2016YFC0904700), The National Key Technology Support Program of the Ministry of Science and Technology of China (2015BAI01B11).

**Corresponding author.

LI Ping. Tel: 86-931-4969173, E-mail: liping@impcas.ac.cn

LI Qiang. Tel: 86-931-4969316, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn

Received: September 6, 2016 Accepted: March 1, 2017